

# Modulation of Mg<sup>2+</sup>-dependent (3H)TCP binding by L-glutamate, glycine, and guanine nucleotides in rat cerebral cortex

著者	Hori Takafumi
内容記述	Thesis (Ph.D. in Medical)--University of Tsukuba, (B), no. 887, 1993.3.25 Offprint. Originally published in: Synapse, v.8, pp. 13-21, 1991
発行年	1993
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/1041">http://hdl.handle.net/2241/1041</a>

氏 名(本 籍)	ほり 堀	たか 孝	ふみ 文 (長野県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 乙 第 887 号		
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科		
学 位 論 文 題 目	Modulation of $Mg^{2+}$ -Dependent [ $^3H$ ] TCP Binding by L-Glutamate, Glycine, and Guanine Nucleotides in Rat Cerebral Cortex (ラット大脳皮質における $Mg^{2+}$ 依存性 [ $^3H$ ] TCP結合のL-グルタミン酸, グリシン, グアニンヌクレオチドによる調節) (掲載誌: Synapse, Vol. 8, 13-21, 1991)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	三 輪 正 直
副 査	筑波大学教授	医学博士	大 野 忠 雄
副 査	筑波大学教授	医学博士	小 田 晋
副 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年
副 査	筑波大学教授	医学博士	山 下 亀 次 郎

## 論 文 の 要 旨

### 〈目的〉

フェンサイクリジン (以下PCP) はヒトで精神分裂病様の多彩な精神症状を惹起することから、PCPによる精神障害は精神分裂病のモデルとして有用と考えられている。脳内でPCP受容体は、興奮性アミノ酸のN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体やグリシン受容体と共役し、イオンチャネル複合体を形成している。また二価のマグネシウム ( $Mg^{2+}$ ) は、1～2 mMの生理的濃度でPCP結合を抑制的に調整している。臨床的に低マグネシウム血症で幻覚などの精神症状を呈することから、PCP結合に対する $Mg^{2+}$ による調節機構についての研究は、精神症状の発現機序の解明につながる重要な意義をもっている。

本研究の目的は大脳皮質膜標品を用いてPCP結合に対する $Mg^{2+}$ の作用を詳細に検討し、さらに $Mg^{2+}$ の作用に対するL-グルタミン酸, グリシン, グアニンヌクレオチドの影響についても調べ、PCP受容体の薬理学的性質を明らかにすることにある。

### 〈方法〉

1) Wistar系雄性ラットの大脳皮質を用いてPCP受容体を含む膜標品 (シナプトソーム分画) を調製した。本研究では、可能な限り内在性のアミノ酸や陽イオンを除去する必要があるため、

に膜標品の調製段階でpreincubation, freezing-thawing, 反復洗浄を行った。

2) PCP類似化合物である [ $^3\text{H}$ ] N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl] 3, 4-piperidine (以下 [ $^3\text{H}$ ] TCP) の受容体への結合実験は, 5nM [ $^3\text{H}$ ] TCP及び種々の濃度のL-グルタミン酸, グリシン,  $\text{Mg}^{2+}$ または水解されないGTP誘導体である100 $\mu\text{M}$  GppNHpと膜標品とを室温にて1時間反応させた後, セルハーパーバスターにより吸引ろ過した。反応に用いた5mM Tris-HCl bufferで4回洗浄した後, 受容体に結合した放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。また特異的結合は30 $\mu\text{M}$  PCP存在下に同様の実験を行って得られた放射活性を全結合量から差し引いてもとめた。

3) 反応開始5分から24時間の6時点での特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合量からassociation rateを, 解離開始5分から40分の6時点での結合量からdissociation rateをもとめた。

#### <結果>

1) L-グルタミン酸及びグリシンは濃度依存性に [ $^3\text{H}$ ] TCPの受容体への特異的結合を増加させた。その最大結合量は反復洗浄した膜標品を用いた本実験で, 従来報告に比して最も高い値が得られ, 内在性のアミノ酸が十分除去された標品であることを示していた。

2) 受容体への特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合量に対して $\text{Mg}^{2+}$ は300 $\mu\text{M}$ で $\text{Mg}^{2+}$ 非存在下の約4倍の結合の極大値を示した。またL-グルタミン酸及びグリシンによる特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合量の増加は $\text{M}^{2+}$ 濃度により大きく左右された。すなわち特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合は10 $\mu\text{M}$  L-グルタミン酸存在下では10 $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ で約6倍の極大値を, また10 $\mu\text{M}$ のグリシン存在下では100 $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ で約4倍の極大値を示した。10 $\mu\text{M}$ 以下の $\text{Mg}^{2+}$ 存在下での10 $\mu\text{M}$ のL-グルタミン酸あるいはグリシンによる特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合の増加は相加的であった。

3) 反応速度に対する影響については, 300 $\mu\text{M}$ の $\text{Mg}^{2+}$ または10 $\mu\text{M}$  L-グルタミン酸は [ $^3\text{H}$ ] TCP結合のassociation rateとdissociation rateとを共に3~5倍上昇させた。また, 10mMの高濃度の $\text{Mg}^{2+}$ は300 $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ 同様反応初期速度を上昇させたが, 1時間以降で平衡に達する [ $^3\text{H}$ ] TCPの結合量を $\text{Mg}^{2+}$ 非存在下の約50%に低下させた。

4) アミノ酸が存在しない場合は,  $\text{Mg}^{2+}$ のすべての濃度においてGTP誘導体のGppNHpは [ $^3\text{H}$ ] TCPの結合をわずかに低下させた。しかし10 $\mu\text{M}$ グリシン存在下では $\text{Mg}^{2+}$ が10-100 $\mu\text{M}$ の範囲に限ってGppNHpは [ $^3\text{H}$ ] TCP結合量を著しく低下させ, グリシンによる活性化が殆ど消失した。一方GppNHpはアミノ酸非存在下及び10 $\mu\text{M}$ グリシン存在下での1mM以上の高濃度の $\text{Mg}^{2+}$ による特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合抑制には影響を与えなかった。10 $\mu\text{M}$  L-グルタミン酸存在下ではGppNHpは30 $\mu\text{M}$ 以下の $\text{Mg}^{2+}$ による結合活性化を消失させた。

#### <考察>

以上の結果はNMDA/PCP受容体イオンチャネル複合体に作用の異なった2種類の $\text{Mg}^{2+}$ 結合部位が存在している可能性を示唆している。すなわち生理的濃度である1mM以上の高濃度で特異的 [ $^3\text{H}$ ] TCP結合に抑制的に働く低親和性 $\text{Mg}^{2+}$ 結合部位と, 本研究で明らかとなった低濃度で特異

的  $[^3\text{H}]$  TCP結合に促進的に作用する高親和性 $\text{Mg}^{2+}$ 結合部位である。さらに、この高親和性 $\text{Mg}^{2+}$ 結合部位はL-グルタミン酸やグリシン結合部位とも異なるが、これらの結合部位によって大きく調節を受け、またGTP結合部位が共役している可能性が示唆された。このことから生理的濃度の $\text{Mg}^{2+}$ はPCP受容体を抑制的に調節しているが、低マグネシウム血症では、この抑制が解除されPCP受容体を活性化して精神症状の発現を引き起こしている可能性が示唆された。

## 審 査 の 要 旨

精神分裂病は重篤な精神障害であり、その病因については未だに不明な点が多い。その症状発現に脳内ドーパミン伝達の過剰が関与していると考えられているが、それだけで精神分裂病の病態を理解することは困難である。PCPの精神障害はより包括的な精神分裂病モデルとして注目されている。本研究はPCP受容体への結合に対する $\text{Mg}^{2+}$ の調節様式を詳細に解析し、さらにGTP結合部位が一部のアミノ酸と共役している可能性を示すなどPCP受容体の薬理学的性質を解明したことで、今後の精神分裂病研究に貢献するものとして高く評価される。また本研究は、将来的にはPCP受容体のクローニングなどの分子レベルの研究や、内在性リガンドの解明などに発展させられるべきものである。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。